



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2023-09-20

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Zakład Terapii Fagowej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirszfeld.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Agnieszki Sosnowskiej

pt. „Charakterystyka mutantów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z populacji traktowanej fagami litycznymi”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Eweliny Sosnowskiej została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor Zuzanny Drulis-Kawy i promotor pomocniczej Pani Doktor Grażyny Majkowskiej-Skrobek, w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca dotyczy szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych po traktowaniu populacji bakteryjnej litycznymi bakteriofagami, specyficznymi do tej bakterii.

Praca ma charakter tradycyjnej monografii, obejmującej takie typowe rozdziały jak *Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Bibliografia*. Ponadto uwzględniono elementy pomocnicze jak *Spis treści, Streszczenie, anglojęzyczny Abstract*, a także *Wykaz ilustracji, Wykaz tabel, Wykaz skrótów*. Struktura pracy jest więc w większości typowa, prawidłowa i kompletna.



Przystępując do analizy treści przedstawionej do oceny pracy, chciałabym zacząć od przejrzystego i dobrze napisanego wstępu. Wstęp daje dobrą podstawę teoretyczną dla zrozumienia pozostałych części rozprawy, Doktorantka zadbała o to, aby wszystkie zagadnienia, które zawarła w części opisującej wyniki zostały odpowiednio wprowadzone i omówione we wstępie. W zakresie merytorycznym mam do tej części pracy następujące drobne uwagi:

1. Na stronie 11 w pierwszym akapicie znajduje się opis zastosowanej u pacjenta i opisanej w publikacjach terapii fagowej, niestety jest całkowicie niejasne co właściwie wykonano i co przyniosło, a co nie przyniosło oczekiwanego efektu terapeutycznego. Jakie wnioski co do terapii fagowej w infekcjach *K. pneumoniae* można wysnuć na podstawie tych publikacji?
2. Na stronie 22 znajduje się opis pułapek neutrofilowych, który, być może z powodu potknięcia językowego, zawiera błąd; chciałabym prosić o krótkie wyjaśnienie jak pułapki neutrofilowe są zbudowane
3. Na stronach 24-25 mamy krótki akapit dotyczący roli depolimeraz i rozpoznawania receptora u fagów *K. pneumoniae*, chciałabym prosić o omówienie roli depolimeraz w tym rozpoznaniu
4. W tabeli nr 1 na stronie 26 mamy kilka fagów, dla których podano nieaktualną pozycję taksonomiczną, proszę Doktorantkę o podanie aktualnej
5. Na stronie 36 znajdujemy opis konkurencji fagów o tzw. „wspólne dobra”, jednak doprecyzowanie czym te „dobra” są jest zaskakujące. Proszę o dodatkowy komentarz dotyczący konkurencji o podstawowe elementy budulcowe, jak aminokwasy lub nukleotydy, a także o zasoby energetyczne komórki

Rozdział *Cel pracy* uważam za wyjątkowo dobrze i jasno sformułowany, nie mam żadnych uwag do tej części pracy.

Rozdział *Materiały i metody* uważam za dobrze i szczegółowo opracowany, znajdujemy w nim wszystkie niezbędne opisy procedur, a także informację o strategii przygotowania i porównania prób poddanych analizie. Drobne uwagi do tej części pracy są następujące:



1. Również tutaj znajdujemy nieistniejące już rodziny fagowe wymienione w taksonomii fagów (Tabela nr 3)
2. Czy były jakieś konkretne powody (np. dane literaturowe) dla przyjęcia poziomów odcięcia inaktywacji fagów na poziomie 50% a wrażliwości bakterii na surowicę na poziomie min. 2 rzędów wielkości CFU (str. 46)
3. Czy rzeczywiście rekombinowane depolimerazy przechowywano w tem. – 4 st. C, a jeśli tak to dlaczego (czy też jest to omyłka pisarska; str. 51)

Wyniki przedstawione w pracy są obszerne, spójne, dobrze przedstawione. Opis jest dość drobiazgowy i opatrzony dużą liczbą rycin i tabel, które są niezbędne dla zrozumienia tej części rozprawy. Uważam, że zakres wykonanych prac jest szeroki, ambitny i z pewnością pozwolił na zdobycie szerokich umiejętności i pogłębionej wiedzy przez Doktorantkę. Mam jednak kilka uwag do tej części pracy.

1. Największe wątpliwości wzbudza rozdział poświęcony analizie zjadliwości mutantów, ponieważ znajdujemy tam w kilku miejscach (np. str. 97) stwierdzenia, że zastosowanie fagów wpływa na zmniejszenie wirulencji szczepów bakteryjnych, podczas kiedy nie do końca znajduje to odzwierciedlenie w przedstawionych danych. Na przykład na rysunku nr 67 widać wyraźnie, że szczepów o zwiększonej zjadliwości przybyło po zastosowaniu faga KP27, podobnie na rysunku nr 64, wątpliwości budzi też taka interpretacja w wypadku rysunku 65.
2. Na rysunkach 61 i 61 prawdopodobnie zamieniono opisy paneli A i B – proszę o weryfikację.
3. Mam też pytanie, na ile reprezentatywne dla całej populacji o określonym profilu są klonów, które przedstawiono na rysunkach 59-63
4. Na stronie 89 znajdujemy stwierdzenie, że „podsumowując, presja selekcyjna fagów w kierunku uwrażliwienia na dopełniacz może wynikać głównie ze zmian powstałych w strukturze LPS”, nie jest jednak jasne, co prowadzi Doktorantkę do tej konkluzji.
5. Proszę również o komentarz do raportowanej w każdym kolejnym rozdziale sporej zmienności wśród klonów kontrolnych, czyli hodowanych bez presji selekcyjnej ze strony fagów. Czy jest to naturalna sytuacja i z czego może ona wynikać?



6. Rysunek 33 posiada niepełną legendę
7. Rozdział dotyczący analizy profili antybiotykooporności zawiera pewną liczbę nieścisłości, na przykład w opisie profilu Kp77 znajdujemy informację, że w grupie kontrolnej pojawił się 1 klon bakteryjny oporny na TZP wyizolowany z planktonu- tymczasem grafika przedstawia jedynie 2 klony na linii tzw. *cut-off*. Dalej mamy informację o 3 klonach opornych na ciprofloksacynę w biofilmowej grupie Kp77/KP34 (widzę 5). Opis rysunków 69-70 wymagałby więc uporządkowania i korekty omyłek tego typu.

Dyskusja przedstawiona w pracy jest zwięzła, ale wystarczająca, jest też w większości adekwatna do zaprezentowanych wyników. Dobrze lokuje nowe, zawarte w pracy obserwacje na tle istniejącego stanu wiedzy, jest ciekawa i dowodzi dobrego rozeznania Doktorantki w aktualnej literaturze w dziedzinie. Mam dwie uwagi do tej części pracy.

1. Pierwsza dotyczy również interpretacji obserwacji zmian wirulencji badanych klonów. Na stronie 154 znajdujemy informację, że „były przypadki klonów o zwiększonej wirulencji”. Wydaje się to zbyt łagodnym stwierdzeniem w świetle zaprezentowanych danych. Klonów tych było w przebadanych populacjach dość dużo, niejednokrotnie zaś miały wśród bakterii poddanych działaniu fagów istotniejszy udział niż w populacji kontrolnej. Zabrakło mi więc komentarza do tych obserwacji.
2. Na stronie 152 znajdujemy informację o „szybkim selekcjonowaniu oporności bakterii na stosowane fagi w trakcie terapii”. Czy rzeczywiście tak jest? Czy dane literaturowe na temat prawdziwej terapii fagowej u ludzi i zwierząt są rzeczywiście zbieżne z tym, co raportowano dla kultur laboratoryjnych bakterii i fagów?

Na koniec chciałabym podkreślić, że wskazane w niniejszej recenzji niedociągnięcia nie stanowią istotnego problemu dla ogólnej wartości pracy, którą oceniam wysoko. Chcę też podkreślić, że jest to jedna ze starannie opracowanych, edytowanych i uporządkowanych prac doktorskich, jakie oceniałam. Literówki czy potknięcia językowe, błędy w przypisaniu numerów rycin, tabel, odsyłaczy itp. właściwie w niej nie występują, a czytanie tak starannie przygotowanej rozprawy było dużą przyjemnością.



Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą stwierdzam, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników spełnia zawiązką wymagania stawiane pracom doktorskim. Przeprowadzone badania dowodzą wysokich umiejętności w zakresie mikrobiologii, biologii molekularnej i bioinformatyki. Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą oryginalny wkład w zrozumienie w jaki sposób presja selekcyjna ze strony bakteriofagów zmienia właściwości szczepów bakteryjnych. Rozprawa została napisana ciekawie, zrozumiale i wyjątkowo starannie. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia w mojej ocenie wymagania stawiane ustawowo i zwyczajowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Eweliny Agnieszki Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
kierownik
LABORATORIUM BIOLOGII
MOLEKULARNEJ BAKTERIOFAGÓW
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

